

17
3/16
1979
1981

① BUNDESREPUBLIK ① Offenlegungsschrift ① Nr. 2
DEUTSCHLAND ① DE 29 44 138 A 1 G 01 N 35/06



DEUTSCHES
PATENTAMT

① Abgrenzung
② Ausgestaltung
③ Offenlegungsschrift

P 29 44 138 I 52
2 11 79
11 6 81

DE 29 44 138 A 1

① Anmelder
Technicon GmbH, 5385 Bad Vilbel, DE

② Erfinder
Aspmann, Prof. Dr. med., Genf, Helv. Dr. rer. nat.
Hans-Dietrich, AGS München, DE, Saatchi, Dipl.-Chem.
Dr. rer. nat., Werner, 3610 Uster, DE, Weber, Dipl.-Phys.,
Rhein, 5380 Niederortend, DE

Prüfungssatz gem. § 44 PatG ist gestellt

④ Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in automatisierten Analysensystemen unter Abtrennung von Störsubstanzen

Preis
Reichel
6111

TECHNICON

1. Verfa.
Analyse
Durchfluss
da d u r
daß man d
tenen ode
Inkubatio
führten A
Probenstr
durch Abs
einen all

2. Verfa.
Lipoprote
Über die
da d u r
daß man a
aus Phosph
Density-Li
ausfällt,
tion den a
bleibenden
und der er

1011

DE 29 44 138 A 1

M. G. A.
G 91 N 38/08

DE 29 44 138 A 1

Dr. G. H. H. H.
Inventor, Dipl.-Chem.
I. Weber, Dipl.-Phys.

Patentanwälte
Reichel u. Reichel
8 Frankfurt a. M. 1
Postfach 13

2961

2944138

TECHNICON GMBH, 6360 Bad Vilbel 1

Patentansprüche

1. Verfahren zur Durchführung von Analysen in automatischen Analysensystemen, die nach dem Prinzip des kontinuierlichen Durchflusses arbeiten, unter Abtrennung von Niederschlägen, das durch gekennzeichnet ist, daß man den in einer zu analysierenden Flüssigkeit enthaltenen oder in ihr erzeugten Niederschlag - ggf. nach einer Inkubationszeit - in einem horizontal und geradlinig geführten Abschnitt eines gleichmäßig mit Luft segmentierten Probenstromes absetzen läßt, den sedimentierten Niederschlag durch Absaugen entfernt und aus dem verbleibenden Probenstrom einen aliquoten Teil zur Analyse entnimmt.
2. Verfahren nach Anspruch 1 zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL), insbesondere in Körperflüssigkeiten, über die Messung des Cholesteringehalts, das durch gekennzeichnet ist, daß man aus der verdünnten Probe durch Zusatz eines Reagenzes aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid die Very-Low-Density-Lipoproteine (VLDL) und Low-Density-Lipoproteine (LDL) ausfällt, die Probe anschließend inkubiert, nach Sedimentation den abgesetzten Niederschlag absaugt und aus dem verbleibenden Flüssigkeitsstrom einen aliquoten Teil entnimmt und der enzymatischen Cholesterinanalyse zuführt.

130024/0034

3.
Ar
de
fl
ne
st
zu
ti
or
le
si
d
da
le
le
zu
ge
di
ac
ke

4.
fa
d
da
we
le
sp
Ei
sp
de
is

1138

- 2 -

2944138

3. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 mit durch eine Förderpumpe -perrbaren und für den Durchfluß freigegebenen Zuführungsleitungen für Waschflüssigkeit, Luft, Probe und Reagenzien, einem Probennehmer, der von einem Probenteller Anteile der zu untersuchenden Flüssigkeit und Waschflüssigkeit in die Zuführungsleitung eingibt, einer Einmündung der Luftleitung in die Probenleitung, einer stromabwärts davon angeordneten Einmündung einer Reagenzienleitung in die Probenleitung, einer davon stromabwärts angeordneten Mischspirale mit Heizbad sowie einem Fotometer und einem Registriergerät, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Einmündungen von Luft- und Reagenzienleitung, ggf. nach der Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und bzw. oder Einschaltung einer Mischspirale (5) zur Inkubation der Ausfällung, eine aus horizontal und geradlinig verlaufenden Leitungsabschnitten bestehende Sedimentationschlange (6) mit einem Auslaß für den Niederschlag (B) und einem Auslaß für die überstehende Flüssigkeit (A) vorgesehen ist.

4. Vorrichtung gemäß Anspruch 3 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Einmündung der Luftleitung und der Sedimentationschlange (6) die Einmündung einer Füllungsreagenzienleitung und stromabwärts davon daran anschließend eine Mischspirale (5) vorgesehen sind und daß der Abschnitt von der Einmündung der Füllungsreagenzienleitung bis zum Ende der Mischspirale (8, 5) aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen, besteht oder mit ihm ausgekleidet ist.

130024/0034

atischen
lichen
lagen,

thal-
einer
ge-
erten
erschlag
obenstrom

Density-
ten,

leagensee
y-Low-
line (LDL)
menta-
ver-
nimmt

77

Vc

m

di

el

Te

el

ts

ds

bz

fu

Ja

Al

al

zu

HD

ra

Ge

ge

st

kr

4138

- 3 -

2944138

TECHNICON CORP., 6368 Bad Vilbel-1

Verfahren und Vorrichtung zur Durchführung
von Analysen in automatischen Analysensystemen
unter Abtrennung von Niederschlägen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Durchführung von Analysen in einem kontinuierlichen Fließsystem unter Abtrennung von Präzipitaten, die entweder mit der Probe zugeführt werden oder im Verlauf einer Reaktion entstehen. Die Analyse wird dann mit einem Teil des klaren Überstandes durchgeführt.

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Bestimmung von High-Density-Lipoproteinen (HDL) über die Messung des Cholesteringehaltes, bei dem zuvor die Low- und Very-Low-Density-Lipoproteine (LDL bzw. VLDL) ausgefällt werden müssen.

Die Hypercholesterämie ist als primärer Risikofaktor für das Auftreten der koronaren Herzkrankheiten seit 25 Jahren bekannt. Jüngste Befunde scheinen allerdings an der Allgemeinverbindlichkeit des Gesamt-Serumcholesterinspiegels als eines Risikofaktors gewisse Modifikationen erforderlich zu machen. In vielfältigen Studien konnte die Bedeutung des HDL-Cholesterins nachgewiesen werden. Aufgrund einer Vielzahl von Befunden stellte sich das HDL-Cholesterin - im Gegensatz zum Gesamt-Cholesterin - als ein Schutzfaktor gegen die koronare Herzkrankheit dar; niedrige HDL-Cholesterinspiegel sind als Risikofaktor für die koronare Herzkrankheit anzusehen.

130024/0034

für
nach-
sch-
ter-
oben-
lei-
ange-
troben-
spirale
ergerät.

en-
ens-
e (5)
nd
de Se-
eder-
saig-

s Ver-

Sodi-
reagenz-
ne Misch-
n der
ler Misch-
beson-
gekleidet

eine
Des-
rer
lic-
abu-
in

Fir-
ell
kan
set
gen
sti
vor
ein
ein
tio
des

ge
ver
una
Pip

1
ch-

ge-

138

- 4 -

2944138

HDL-Cholesterin lässt sich einfach und spezifisch durch eine enzymatische Reaktion mit nachfolgender Farbentwicklung bestimmen, wenn zuvor die anderen Lipoproteine mit geringerer Dichte abgetrennt werden. Aus einer Reihe von Veröffentlichungen geht hervor, daß ein Reagenz aus Phosphorwolframsäure und Magnesiumchlorid spezifisch VLDL- und LDL-Anteile im Serum ausfällt, während HDL in Lösung verbleibt.

Aus der Methodenbeschreibung "HDL-Cholesterin" der Firma Boehringer Mannheim aus dem Jahre 1979 ist ein manuelles Verfahren unter Einsatz des genannten Reagenzes bekannt, das sich aus den folgenden Arbeitsschritten zusammensetzt: Abmessen der Probe, Zusatz einer abgemessenen Reagenzmenge, Mischen des Ansatzes, Inkubation für eine bestimmte Zeit, Zentrifugation für eine bestimmte Zeit mit vorgegebener Leistung, Abnahme des Überstandes, Einsatz eines aliquoten Teils zur Cholesterinbestimmung, Zugabe einer abgemessenen Menge von Cholesterin-Reagenz, Inkubation für eine bestimmte Zeit und fotometrische Bestimmung des entstandenen Farbstoffes.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine derartige aufwendige manuelle Arbeitsweise durch ein automatisches Analysenverfahren zu ersetzen, das sich dadurch auszeichnet, daß unabgemessene Proben eingesetzt werden können und keine Pipettier- und Zentrifugierschritte erforderlich sind.

Gegenstand der Erfindung sind das in den Ansprüchen 1 und 2 gekennzeichnete Verfahren sowie die in den Ansprüchen 3 und 4 gekennzeichnete Vorrichtung.

Die Erfindung wird im folgenden an Hand von Zeichnungen näher erläutert, worin

130024/0034

d eine
onti-
taten,
Verlauf
einem

en und
opre-
s, bei
(LDL

hofaktor
: 25
an der
aspiro-
derlich
lung des
r Viel-
- im
ktor
Chole-
e Herz-

verla:
Prober

erfin:
einri

fahrr-

bedeu

sind
dungs

sigkel
benach
und in
Dichte
der un
Sedime:
abgesa
Nieder
tionas
Teil a
segmen
und in
ausgew

344138

- 5 -

2944138

isch durch
entwicklung
t geringe-
Veröffent-
orwollfram-
DL-Anteile
t.

n° der
ein mami-
nnes be-
zusammen-
nen Res-
eine be-
zeit mit
Minuten
Zugabe
Inkuba-
vatisierung

e aufwendi-
Analysen-
net, daß
d keine
sind.

sprächen
en Ansprü-

Zeichnun-

Fig. 1 eine schematische Darstellung des Strömungsverlaufs in einem durch zwei Luftblasen-segmentierten Probenabschnitt.

Fig. 2 eine schematisierte Ansicht einer bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendeten Sedimentations-einrichtung und

Fig. 3 ein Fließschema des erfindungsgemäßen Ver-fahrens

bedeuten.

Für eine ausreichende Sedimentation in vertretbarer Zeit sind zwei Voraussetzungen notwendig, wie sie in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwirklicht sind:

1. Gleichmäßige Luftsegmentierung des Stromes,
2. horizontaler und geradliniger Fluß bei Vermeidung jeglicher Störung des Strömungsverhaltens, wie er gemäß Abb. 1 zu einer völlig symmetrischen Strömungsverteilung führt.

Durch die zweiseitige Begrenzung des strömenden Flüssigkeitssegments mit zwei Luftblasen werden die der Wand benachbarten Flüssigkeitsschichten in die Mitte des Segments und in Fließrichtung transportiert. Teilchen mit größerer Dichte als der der Flüssigkeit reichern sich sehr schnell in der unteren Hälfte des Flüssigkeitssegments an. Wird nach der Sedimentationsstrecke etwa die Hälfte des Stroms nach unten abgesaugt, verbleibt ein fast klarer Überstand. Verbleibende Niederschlagareste setzen sich auf einer zweiten Sedimentationsstrecke ab. Zur Analyse wird von oben ein aliquoter Teil abgenommen und in bekannter Weise etwa mit einem luft-segmentierten Strom aus Analysenreagens in Kontakt gebracht und inkubiert, wonach die erhaltene Farbreaktion fotometrisch ausgewertet wird. 130024/0034

D
Anspruch
angewand
Probeneu
saugten
und inku
Absaugen
ändert s
rig-fett
wenn die
Schluß s
Die Best
Niederac
entsprec

O
4
RCI
CT

HC

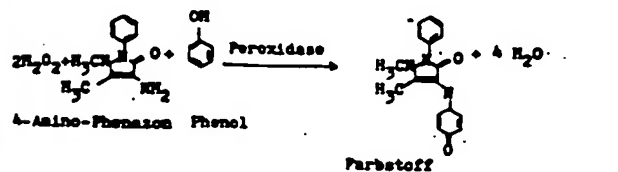
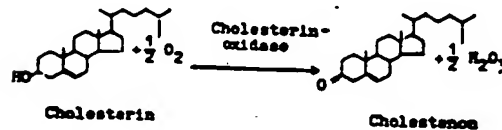
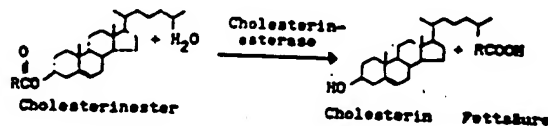
$2H_2O_2 + H_2$
 H_2C
4-Amino-

138

- 6 -

2944138

Das allgemeine Verfahren nach Anspruch 1 wird gemäß Anspruch 2 zur automatischen Bestimmung von HDL-Cholesterin angewandt. Das Verfahren verläuft vollautomatisch von der Probenaufnahme bis zur fotometrischen Auswertung. Die angesaugten Proben werden verdünnt, mit Fällungsreagenz versetzt und inkubiert, bevor der Niederschlag nach Sedimentation durch Absaugen entfernt wird. Der Niederschlag der Lipoproteine verändert sich im Verlauf der Inkubation: Anfangs ist er schmierig-fettig und bleibt daher leicht an der Gefäßwandung haften, wenn diese nicht aus antistickweisem Material besteht. Zum Schluß besitzt er jedoch eine fast körnige, feste Konsistenz. Die Bestimmung der Cholesterinkonzentration erfolgt in der vom Niederschlag befreiten Lösung nach einer enzymatischen Reaktion entsprechend den folgenden Gleichungen:



130024/0034

ungs-

der
one-

Ver-

rer Zeit
rfin-

idung
ie er
trö-

Flu-
and
egmente
erer

nell in
nach der
unten
elbende
sente-
ter

luft-
bracht
netrisch

gemäß
eines
heit.
terer
hält
Küve-
Zink-
fitt:
adhl:
(PTT:
gehl.
zu v

Beis:
stoff:
befl:
Darv:
eines
flus:
verm:
den..

nehme
Über
einer
luft:
(1,0
ethy
luft
setz

Die Analysenvorrichtung zur Durchführung der Verfahren gemäß der Erfindung besteht gemäß Fig. 3 beispielsweise aus einem Probennehmer 1, einer Pumpe 2, einer analytischen Einheit, die eine Mischspirale 3, ein Heizbad 7 mit einer weiteren Mischspirale und eine Sedimentationschlange 6 enthält, sowie einem Einkanal-Durchflußfotometer 5 mit einer Küvette von 15 mm Länge und 1,5 mm Durchmesser sowie einem Einkanal-Linienschreiber 4. Vorzugsweise sind das Zugabefitting 8 und die Inkubationschlange 5 aus einem antiadhäsiven Werkstoff, insbesondere Polytetrafluorethylen (PTFE), gefertigt oder mit einem derartigen Werkstoff ausgekleidet, um ein Anhaften der Ausfällungen an der Wand zu vermeiden.

Beispiel

Die Bereitstellung der Proben (Serum) erfolgt in Kunststoffbechern, die sich im Probenteller des Probennehmers 1 befinden. Die Proben werden eine nach der anderen unter Zwischenschaltung von Waschflüssigkeitsabschnitten in einem derartigen Rhythmus angesaugt, daß das Proben/Waschflüssigkeits-Entnahmeverhältnis 6:1 beträgt und 60 Proben/h verarbeitet werden. (Diese Betriebsweise kann variiert werden.)

Das die Waschflüssigkeit enthaltende Gefäß im Probennehmer wird über die Pumpe 2 mit 2 ml Wasser/min versorgt. Über den in der Pumpe 2 installierten Probenschlauch mit einer Förderleistung von 0,16 ml/min wird das Serum in einem luftsegmentierten Strom von Füllungsreagenz mit Netzmittel (1,0 ml/min) über eine Zugabestelle 8 aus Polytetrafluorethylen (PTFE) zudosiert. Der Luftschlauch fördert 0,42 ml Luft/min. Das Füllungsreagenz ist wie folgt zusammengesetzt:

0,5 %
6,25 mM
20 mM
pH 7,1
5 ml P:

Nach ca.
25 Windungen
schlange 6:
schlag 8 wi:
Überstand =
Flüssigkeit
Luft segmen
ter in eine
optische Gl
Probe entst
gemessen. 2

Va/Gu

0,5 % Phosphorwolframsäure
6,25 mM Magnesiumchlorid
20 mM Natriumhydroxid
pH 7,1
5 ml Polyoxyethylenlaurylather (Brij 35) pro 1000 ml

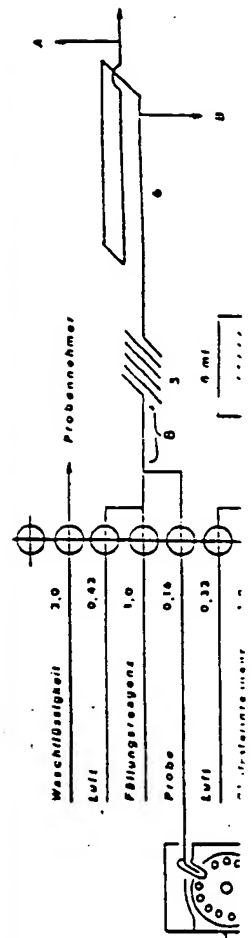
Nach der Inkubation in der PTFE-Mischspirale 5 mit 25 Windungen fließt der Strom durch die Sedimentations-
schlange 6 mit 1 Windung (Fig. 2). Der angereicherte Nieder-
schlag 3 wird mit 0,8 ml/min nach unten abgesaugt. Aus dem
Überstand wird am Ende mit 0,16 ml/min ein Teil A der
Flüssigkeit und der Luftblasen abgenommen und einem mit
Luft segmentierten Strom aus Cholesterinreagens zudosiert,
der in einer Heizschlange bei 37 °C inkubiert wird. Die
optische Dichte des in der enzymatischen Reaktion mit der
Probe entstehenden Farbstoffes wird in Durchflußfotometer 3
gemessen. Das Ergebnis erscheint auf dem Schreiber 4.

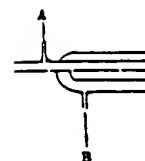
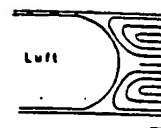
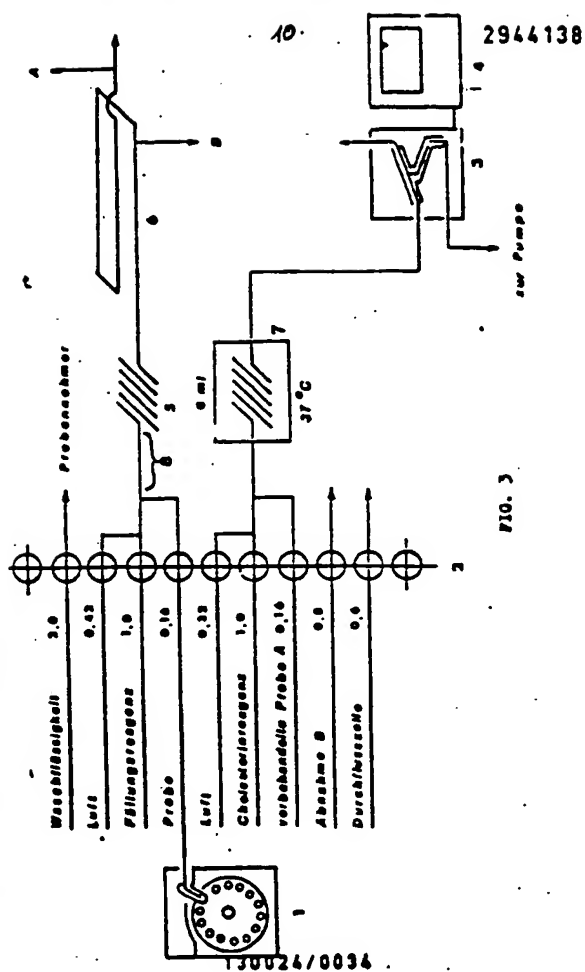
Va/Oa

DERWENT PUBLICATIONS LTD

DERWENT PUBLI

9.
Leerseite





DERWENT PUBLICATIONS LTD

DE

4138

2944138

Nummer: 29 44 138
Int. Cl. 7: G 09 B 23/00
Anmeldungs- 2. November 1959
Offenlegungs- 11. Juni 1960



FIG. 1

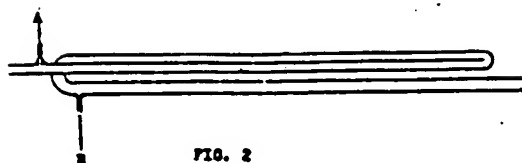


FIG. 2

130024/0034

• GUNDBER:

DEUTSCH:



DEUTS-

PATENT

• Anmelden:

AGS Anstalt
Grafische, für
DE

• Vertriebs- und

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.